

RESUMEN

La presente tesis doctoral, titulada “papel del miR-99a-5p en cáncer de mama: transformando hallazgos moleculares en herramientas clínicas” está centrada en el estudio del microRNA miR-99a-5p en cáncer de mama y en la determinación de su potencial como diana terapéutica y biomarcador para el diagnóstico de dicha enfermedad.

En el primer capítulo, correspondiente a la introducción, se lleva a cabo una revisión general del cáncer de mama. También se presentan los microRNAs, así como su implicación en cáncer y su posible aplicación como dianas terapéuticas y como biomarcadores. A continuación, en el segundo capítulo se presentan los objetivos generales, así como los objetivos específicos de cada capítulo.

En el tercer capítulo se compararon los perfiles de expresión de microRNAs de una línea celular de cáncer de mama resistente a doxorrubicina frente a la línea celular parental, dando lugar a la identificación del microRNA miR-99a-5p como el más desregulado entre ambas. A continuación, mediante ensayos de proliferación celular, citometría de flujo y *western blot*, se confirmó que el miR-99a-5p aumenta la sensibilidad al fármaco. Mediante el ensayo del gen reportero de la luciferasa se confirmó que el miR-99a-5p inhibe la expresión de COX-2 de forma directa, lo que conlleva la inhibición de la expresión de la proteína ABCG2 que está ampliamente descrita por su papel en resistencia a fármacos. La inhibición de ésta última da lugar a un incremento de doxorrubicina intracelular, y por tanto al aumento de la sensibilidad al fármaco. Todo ello fue confirmado mediante PCR, *western blot*, y citometría de flujo. En base a los resultados

obtenidos, se diseñaron nanodispositivos basados en nanopartículas mesoporosas de sílice para la liberación de una combinación de miR-99a-5p y doxorubicina en los tumores. La capacidad de los sistemas para dirigirse específicamente al receptor CD44, que está sobreexpresado en tumores de cáncer de mama, así como para la liberación su contenido de forma específica tras la internalización, fueron testadas *in vitro*. Además, se confirmó la eficacia de las nanopartículas para reducir el crecimiento tumoral así como los efectos adversos asociados a la doxorubicina libre en un modelo ortotópico murino de cáncer de mama.

En el cuarto capítulo, se evaluó el potencial del miR-99a-5p como biomarcador para el diagnóstico del cáncer de mama. En primer lugar, se determinó la expresión del microRNA en tumores primarios de cáncer de mama y se compararon con tejidos sanos. Los resultados mostraron que el miR-99a-5p se encuentra infraexpresado en los tejidos cancerosos. A continuación, con el objeto de determinar el potencial del microRNA como biomarcador mínimamente invasivo, se determinaron los niveles de expresión de miR-99a-5p en plasma de pacientes de cáncer de mama y de donantes sanos. En este caso, se encontró que el miR-99a-5p se encuentra a mayor concentración en el plasma de pacientes con cáncer de mama. Estos resultados se validaron en una cohorte independiente. Mediante el análisis en base a curvas ROC se confirmó que el miR-99a-5p es útil como biomarcador no invasivo para el diagnóstico del cáncer de mama incluso en estadios tempranos de la enfermedad.

En base a los resultados obtenidos, en el quinto capítulo se centra el diseño y validación de un biosensor basado en soportes de alúmina mesoporosa para la detección del miR-99a-5p en plasma. Los poros de una

placa de alúmina mesoporosa se cargaron con el indicador fluorescente rodamina B, y se utilizaron oligonucleótidos complementarios a la secuencia del miR-99a-5p como puertas moleculares capaces de retener los fluoróforos en el interior de los poros. En presencia del miR-99a-5p, el oligonucleótido que actúa como puerta reconoce dicha secuencia y es desplazado, dando lugar a la apertura de los poros de modo que se libera la rodamina B, que es posteriormente detectada ópticamente. Se confirmó la especificidad del biosensor, así como su alta sensibilidad. Además, utilizando muestras de plasma de pacientes de cáncer de mama y controles sanos, se confirmó la eficiencia del dispositivo para detectar cáncer de mama incluso en estadios tempranos.

Por último, en los capítulos cinco y seis se presentan la discusión general y las conclusiones principales extraídas. En conclusión, esta tesis doctoral demuestra que el miR-99a-5p es una molécula con potencial como diana terapéutica y biomarcador para el cáncer de mama, y podría ser útil para mejorar el pronóstico de los pacientes con dicha enfermedad. Se ha elucidado que uno de los mecanismos por los que el miR-99a-5p está involucrado en sensibilidad a doxorrubicina es mediante la regulación del eje COX-2/ABCG2. Además, las nanopartículas diseñadas para la administración combinada de miR-99a-5p y doxorrubicina se presenta como una herramienta con gran potencial para el tratamiento oncológico, y podría ser útil para la administración de microRNAs como terapia. Por último, aprovechando el potencial del miR-99a-5p como biomarcador diagnóstico, se ha desarrollado un sistema de detección que podría ser una herramienta útil para mejorar la detección temprana del cáncer de mama.